

胆石の化学的分析

第1編：胆石構成成分の抽出法と定量法に関する研究

京都大学医学部外科学教室第2講座（指導：日笠頼則教授）

向 原 純 雄

〔原稿受付：昭和55年11月10日〕

Chemical Analysis of Gallstones

[I] Extraction and Quantification of Gallstone Components

SUMIO MUKAIHARA

Second Department of Surgery, Faculty of Medicine, Kyoto University
(Director: Prof. Dr. YORINORI HIKASA)

A microchemical technique for the analysis of gallstones is described. This technique is designed for easy, rapid and accurate determination, but it is also capable of dealing with very small quantities of the material to be tested.

1) Gallstones are washed with distilled water, dried, pulverized with an agate mortar, and desiccated to a constant weight. This method requires as little as 10 milligrams of a sample, but allows accurate and separate analysis of thin layers of gallstones.

2) Ten milligrams of gallstone powder is transferred to a 10 ml glass-stoppered centrifuge tube, mixed with the following solvents, and stirred with an ultrasonic stirrer. The tube is centrifuged at 4,000 r.p.m. for 15 minutes. An aliquot of the supernatant is placed in a small test tube. The excess supernatant is aspirated, and the residue is dried. Stepwise solvent extraction consists of: first, petroleum ether 10 ml; second, 1N-hydrochloric acid 10 ml; third, petroleum ether 10 ml; fourth, dimethyl sulfoxide (DMSO) 10 ml. Each extraction procedure takes less 20 minutes.

3) An aliquot of the petroleum ether extract is used for the colorimetric determination of cholesterol by Zak-Henly's method and of fatty acids by Itaya-Ui's method. An aliquot of the hydrochloric acid extract is used for the colorimetric determination of calcium by the OCPC method and of inorganic phosphorus by Goldenberg's method. An aliquot of the DMSO extract is used for the colorimetric determination of bilirubin by the oxidation method.

Furthermore, bilirubin and biliverdin in gallstone are directly extracted with DMSO acidified

Key words: Gallstone, Composition of gallstones, Chemical analysis, Stepwise extraction, Colorimetry.

索引語：胆石，胆石構成成分，化学的分析法，系統抽出法，比色定量法。

Present address: Second Department of Surgery, Faculty of Medicine, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto, 606, Japan.

with 1% volume of 1N-hydrochloric acid. Bilirubin is measured by Malloy-Evelyn's method, and both bilirubin and biliverdin are measured by the bilirubin oxidation method. Biliverdin is determined from the difference between the values of the two methods.

The recoveries of each gallstone component range from 94% to 106% in these colorimetric determinations.

緒 言

胆石の化学的分析は、古くから行なわれてきたが^{9, 40, 35)}、長い分析時間を要し、かつ複雑な操作のため^{14, 66, 32, 42, 25, 33)}、広く一般に普及するに至っていない。

しかし、胆石構成成分を分析し、その組成から胆石を分類することは、胆石症の病態の解明や治療方針の決定に当たり重要で、従来の方法に比して、より簡易で迅速な胆石構成成分の化学的分析法の開発が是非とも必要となる。それ故、著者は新たな観点から、胆石の化学的分析法に検討を加え、簡易で迅速にその操作を行なうことができ、しかも微量の試料でも正確に実施し得る分析法を開発しようと意図した。

実 験 方 法

[I] 試薬及び装置

Bilirubin (Sigma grade), Biliverdin dihydrochloride (grade II) は Sigma Chemical Co. より購入、その他の抽出や比色定量に用いる試薬は、全て JIS 特級試薬 (関東化学) を使用した。

試料の秤量は島津 LM-20 型微量直示天秤によった。試料と溶媒の攪拌は Bransonic® 220 型超音波振盪器を利用し、また抽出残渣の遠心分離には久保田 KN-20 型卓上多本架遠心機を利用した。

比色定量は日立 200-10 型ダブルビーム分光光度計にて、赤外線吸収スペクトル分析は日立 215 型回折格子赤外分光光度計にて、それぞれ行なった。

[II] 試 料

手術により摘出したヒト胆石は直ちに、蒸留水にて数回洗浄し、表面に付着している胆汁等を完全に除去した。暗所において自然乾燥後、清拭したペーパーナイフで真二つに分割し、剖面からメスの刃先で試料を 1~10 mg 採取した。肉眼的にその剖面像から、組成や構造が異なると判断される幾つかの層構成単位より胆石が成り立っていると思われた場合には、それぞれの部位から別個に試料を採取した。この試料は瑪瑙乳

鉢を用いて粉碎し、微細な粒子とした上、シリカゲルを入れたデシケーター中で減圧乾固させ、重量が一定になるまで水分を十分に除去した後、更に光による試料の変化を防ぐために、遮光したデシケーター中に保存した。

[III] 抽出操作法とその条件の決定

従来報告されてきた抽出法は、長時間の複雑な操作と大量の試料を必要とした。そのような欠点を改良する目的で、まず超音波振盪器を利用して試料と溶媒を強力に攪拌し、更に遠心分離法によって上清と抽出残渣の簡易かつ迅速な分離を行なうようにした。抽出の際に使用する容器は、全て気密性の高いすり合わせ部分を有するガラス栓付遠心管とした。超音波振盪により目的物質は、数分という短時間内に十分に抽出し得た。抽出終了後の溶媒と抽出残渣との分離には、従来濾過法^{65, 42, 25)}が採用され行なわれてきたようであるが、遠心分離法を導入した。それによって抽出操作は終始同一容器内で行なえるようになり、容器交換による試料の減量は防止されるに至った。また、上清からの検体採取、更には上清の吸引除去による抽出残渣との分離等、その操作過程は終始極めて簡略となった。

胆石の主たる構成成分としては、コレステロール、脂肪酸カルシウム、ビリルビンカルシウム、炭酸カルシウム、磷酸カルシウム、蛋白質等が与っており、その他にも、微量のコレステロールエステル、遊離脂肪酸、遊離及び抱合型胆汁酸、レシチン、多糖類、Mg、Cu 等の金属類が含まれている。従って、脂肪成分の抽出に用いる溶媒として、アセトン、石油エーテル、ジエチルエーテル、メタノール、エタノール、Folch 液 (メタノール: クロロホルム, 1: 2)、Bloor 液 (エタノール: ジエチルエーテル, 3: 1)^{15, 17)} を、無機物質に対するそれとしては、1N 及び 4N 塩酸を、ビリルビンに対するそれとしては、クロロホルム、N, N-dimethyl formamide (DMFA), dimethyl sulfoxide (DMSO)⁴⁹⁾ をそれぞれ使用した。そして、このような各種溶媒による、超音波振盪法や遠心分離法を応用

した抽出操作に必要な条件, 抽出回数, 抽出に際しての混入物の有無, 抽出の順序, 抽出操作に伴う胆石構成成分の変化等について, コレステロール系石2個, ビリルビン系石2個, 黒色石1個の合計5個の胆石試料を用いて十分に検討した.

実 験 成 績

〔I〕 抽出条件

1) 石油エーテル抽出

まず試料の一定量 (1~10 mg) を正確に秤量し, 容量 10 ml の共栓付遠沈管にそれをとる. 試料に対して 1 ml/mg の割合となるように, 石油エーテルを正確に加えた後, 図1の如く, 超音波振盪器にて30秒間, 2~3回, 間隔をあけて攪拌振盪する. この操作により, コレステロール, コレステロールエステル, 遊離脂肪酸, レシチンが抽出されることになる¹⁷⁾. 次いで, 4,000 r.p.m. で15分間遠心分離し, 上清と抽出残渣に分離する. 脂肪成分の定量のために, 一定量の検体を石油エーテル層より採取した後, 残りの上清はできるだけ吸引除去し, 更に残存する石油エーテルを N_2 気流下に完全に除去する. そして, 抽出残渣を乾固させる.

a) 石油エーテルを選択した理由は, 他の有機溶媒に比し, ビリルビンや脂肪成分以外の物質が混入する怖れが少なく, 正確に脂肪成分を定量できるという利点があるからである. しかし, 抽出力がやや弱いという欠点があり^{15, 17)}, そこで, この点に関し, 石油エーテルとメタノールとのそれぞれについて, コレステロールの抽出力を比較検討してみた. すなわち, それぞれによって抽出した検体を, 後述する Zak-Henly 法によりコレステロールの定量を行なってみたところ, メタノール抽出による時は, コレステロールを1回で

ほぼ完全に抽出できるが, 石油エーテル抽出による時は, それを2~3回繰り返して行なう必要があった. それでもコレステロール系石や黒色石では, 共に近似した測定値が得られたが, ビリルビン系石ではメタノール抽出による場合の方が常に平均2%位高い値を示した. しかし, ビリルビン系石試料をメタノール抽出すると, 胆汁酸やビリルビンが混入するため, Zak-Henly 法によるコレステロールの定量に際して, 正の誤差を与えることが判明したこともあって, 石油エーテルを選ぶことにした. ただし, コレステロールの測定に際しては, 後述するように2回目の石油エーテル抽出液を1回目のそれに加え, これによって抽出力の弱い欠点を補うようにした.

b) 遊離脂肪酸は, 石油エーテルによる1回の抽出で完全に抽出し得た. メタノール抽出によると, 遠心分離によっても脂肪酸カルシウムがメタノール中に多量混入するため, 正確な遊離脂肪酸量の測定を行ない得ない憾みがある. このような点からも, 混入物の多いメタノール抽出法を差し控え, 石油エーテル抽出法を選択したわけである.

2) 塩酸抽出

次に 1N 塩酸を 1 ml/mg の割合となるように抽出残渣に加え, 再び図1の如き操作を行なう. それによって各種のカルシウム化合物からはカルシウムが, 無機の磷化合物からは磷が, また, その他の Na, K, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn といった金属類も抽出される. なお, 炭酸カルシウムの炭酸は気体となり大気中に拡散する. 遠心分離した後, 無機物質を測定するためにその上清を採取するが, ビリルビン系石では, 遠心分離によっても上清表層に淡褐色の蛋白質様物質が浮遊することがあるため, そのような際にはこれを吸引除去した上,

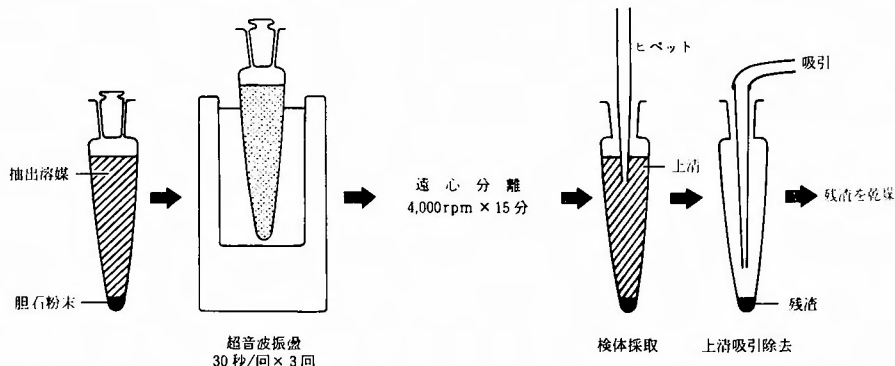


図1 胆石成分の抽出操作法

検体を採取するようにした。上清を除去した後の残渣については、ビリルビン等の胆汁色素の酸化を防ぐために、それを 40~50°C の湯浴中で減圧乾固するか、もしくは N_2 気流下にてそれを乾固させた。

a) カルシウムについては、直ちに 1N 塩酸によって抽出した試料と、400°C、2 時間乾式灰化した後、1N 塩酸で抽出した試料とのそれぞれについて比較検討した。両者をそれぞれ後述する OCPC 法によって、その中に含まれるカルシウムを測定してみると、コレステロール系石と黒色石では、両者共近似した値を示したが、ビリルビン系石から得られた試料では、乾式灰化して測定した値の方が常に高かった。また、4N 塩酸にて抽出後、4 倍に希釈し、遠心分離した際の試料のカルシウム値は、灰化した値にほぼ近似した良好な値を示した。すなわち、ビリルビン系石から得られた試料のカルシウム抽出は、1N 塩酸ではやや不十分であったが、その差は試料全体の 1% 以下であった。遠心分離による抽出残渣との分離や、カルシウム比色定量に用いた OCPC 法の実施に際しては、塩酸濃度が低いほど好都合なこともあって、厳密なカルシウム値の検討を要する際に限り、4N 塩酸抽出・4 倍希釈法でそれを定量し、一般的には 1N 塩酸を使用し、その操作の簡略化を計った。

b) 燐の測定に際しても、試料を直ちに 1N 及び 4N 塩酸によって抽出した場合と乾式灰化した後 1N 塩酸で抽出した場合とのそれぞれについて比較検討したが、ビリルビン系石から得られた試料に於いてのみ、乾式灰化した場合の燐の値の方が 1N 及び 4N 塩酸で試料を直ちに抽出した場合より 0.1~0.2% 位高い値を示す場合があった。これは、ビリルビン系石中に含まれる微量のレシチンによる影響であると考えられ、無機燐

は、1N 塩酸による 1 回の抽出で十分であることが判明した。

3) 石油エーテル抽出 (2 回目)

再び石油エーテル抽出を、前述の操作と全く同様に行なうと、塩酸抽出により脂肪酸カルシウムのカルシウムが除去されているために、脂肪酸が残存するコレステロールと共に抽出されてくる。脂肪酸カルシウムとして存在していたと考えられる脂肪酸の測定を、3 回抽出操作を繰り返し行ない検討してみたが、脂肪酸の抽出については 1 回の操作で十分であった。

なお、前回の塩酸抽出に際して、ビリルビン等の胆汁色素と結合していたカルシウムその他の金属が除去されているため、もしメタノール等の有機溶媒を用いると、胆汁色素が多量溶解してくる。これは、胆汁色素抽出の誤差原因となるばかりでなく、後述の脂肪酸測定に際しても干渉し、正の誤差を生じるために、胆汁色素の混入が最も少ない有機溶媒をこの際には使用する必要がある、石油エーテルが最適の溶媒と考えられた。とはいうものの、石油エーテルによっても胆汁色素による黄色の着色は完全には防ぎ得なかった。

4) DMSO 抽出

前述のような操作後の残渣中の主たる物質は、蛋白質を除けば、ビリルビン等の胆汁色素ということになる。市販のビリルビンとビリベルディンを用いて、クロロホルム、DMFA、DMSO の各種溶媒で、その溶解力を比較検討してみたところ、DMSO は、ビリルビンとビリベルディンの何れをもそれぞれ 1mg/ml 以上溶解する力を有するのに対して、クロロホルムや DMFA は、ビリルビンに対する溶解力がやや弱く、更にビリベルディンともなるとクロロホルムには全く難溶であった。そこで、DMSO を最適の抽出溶媒と

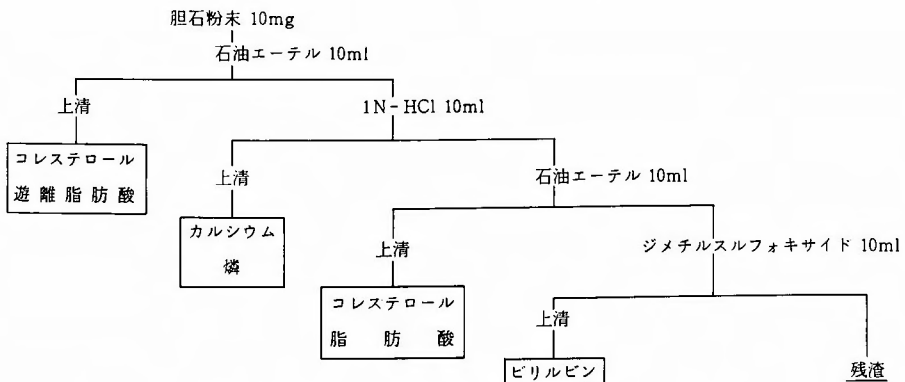


図2 胆石成分の系統的抽出法

して選択することにした。すなわち、試料にそれを 1 ml/mg の割合となるように加え、手動的に十分攪拌することとしたが、DMSO を用いると、1 回の抽出操作で十分であり、2 回目の抽出液中には、全く胆汁色素を検出することができなかった。また、超音波振盪器で攪拌振盪すると、抽出されたビリルビンがビリベルディンに酸化され、茶褐色から暗緑色へと、徐々に変化する現象が認められたこともあって、この際には超音波振盪器の利用は差し控えた。

遠心分離後、胆汁色素を測定するために検体を採取し、その後上清を吸引除去した。残渣は 3 回蒸留水で洗浄した上、遠心分離、乾固し、試験管底より抽出残渣を回収、重量を測定した。これによって抽出操作は全て終了したことになる。

この最終残渣物は、赤外線吸収スペクトルによって分析したが、比較的平坦なスペクトルが得られるのみで、抽出の対象となった物質に特徴的な波形は得られず、抽出目的はよく達成されていることが確認できた。

以上の結果、最も適切な抽出操作は図 1 の如くなる。従って図 2 のように系統的に、1) 石油エーテル、2) 1N (4N) 塩酸、3) 石油エーテル、4) DMSO の順に抽出すれば、胆石試料中の各種構成成分は、少ない誤差で、しかも能率的に抽出されることになる。

5) 胆汁色素の直接抽出法

胆石中の胆汁色素はビリルビンが主成分であるが、他の胆汁色素たとえばビリベルディンなども存在するとされている^{3,10)}。しかし、前述の抽出法による限り、ビリルビンがその操作中に一部変化し、ビリベルディンとなる怖れがあり、しかも、定量に際してはビリベルディンとして測定することもあって、それぞれを正確に別個に定量することができない。そこで、DMSO を利用して胆石試料よりビリルビンとビリベルディンを迅速に抽出する直接法を採用し、後述する 2 種類の比色定量法によって、ビリルビンとビリベルディンをそれぞれ分別定量できるようにした。

胆石中のビリルビン等の胆汁色素は、DMSO 単独では、ほとんど溶解しない。これは、胆汁色素にカルシウム等が結合しているためであるところから、DMSO に予め塩酸を加えることによって、胆汁色素の溶解性を、DMSO と塩酸の混合比を 99:1~90:10 までの 5 段階にわたり検討した。その結果、DMSO:1N 塩酸が 99:1 の容積比で混合されている溶媒が、胆石中の胆汁色素を最も良好に抽出し、しかも、胆汁色素も安定

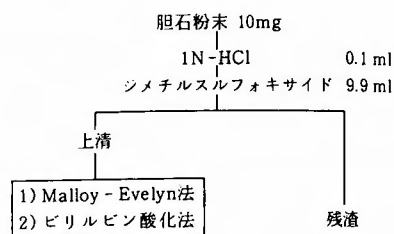


図3 胆汁色素直接抽出法

に維持された。この場合、DMSO と塩酸を予め混合して使用するよりも、試料にまず塩酸を加え約 5 分間放置した後、更に DMSO を追加するようにした方が、より迅速に胆汁色素を抽出し得るようである。なおこの際、塩酸の濃度やその比率を増大させると却って、胆汁色素の変化を進行させる怖れが生ずるので、注意を要する。ビリルビン系石から得られた試料を用いて、このような溶媒によって抽出された胆汁色素の安定性を、分光光度計による可視域スペクトルで検討してみたところ、少なくとも 3 時間はほとんど変化が認められず安定であった。また、抽出残渣について赤外線吸収スペクトルにより、ビリルビンやビリベルディンに特有の吸収波形があるかどうか検討してみたが、それは全く認められず、抽出は 1 回で十分なことが判明した。

以上の事実から DMSO 抽出操作に当っては、図 3 の如く、まず試料の一定量 (1~10 mg) を採り、それに 1N 塩酸を加え、5 分間試料とよく混合した後、更に DMSO を加え、最終的に DMSO:1N 塩酸の割合が 99:1 の容積比となるようにした。この際には超音波振盪器を使用せず、手動的によく混合、4,000 r.p.m. で遠心分離し、上清と残渣に分離した後、その上清を検体として採取するようにした。

【II】比色定量法

胆石中には各種の物質が多数含有されているが、その主たるものは、コレステロール、脂肪酸カルシウム、ビリルビンカルシウム、炭酸カルシウム、磷酸カルシウム等である。従来の文献を検討しても、胆石構成成分の分析は、これら 5 成分を測定すれば十分であるとされている^{66, 32, 43, 25, 23)}。そこで表 1 の如く比色定量法によって、コレステロール、脂肪酸、ビリルビン、カルシウム、磷の測定をそれぞれ行なった。そのうち、無機磷は、胆石中で主に PO_4 塩として存在しているところから¹⁾、それは無機磷の測定値より計算によ

表1 胆石成分の比色定量法

胆 石 成 分	比色定量法	測定範囲
コレステロール	Zak-Henly 法	0~100 mg/dl
脂 肪 酸	Itaya-Ui-久城変法 (パルミチン酸 として測定)	0~ 25 mg/dl
ビ リ ル ビ ン	ビリルビン酸化法	0~ 8 mg/dl
	Malloy-Evelyn 法	0~ 15 mg/dl
カル シ ウ ム	OCPC 法	0~ 20 mg/dl
磷	Goldenberg 法	0~ 20 mg/dl

て PO_4 として算出することにした。また、黒色石や無機石にしばしば含有されている炭酸カルシウムは、塩酸抽出時に炭酸ガスとして大気中に拡散してしまうために、後述するように計算によって算出した。

1) コレステロール

コレステロールの測定には、簡易で正確な Zak-Henly法^{68, 11, 19)}を使用した。2回にわたって行なった石油エーテル抽出の検体を併せ測定するが、検体の石油エーテルを蒸発乾固後、原法に従って操作し、560 nm の波長で比色定量した。

この比色定量に際しては、ビリルビンが干渉物質として作用することが知られているので、市販ビリルビンと石油エーテルとを予め混合し、この点について検討してみたが、ビリルビンが石油エーテルには難溶であることもあって、石油エーテルによる抽出が行なわれた際には、その危惧のないことが判明した。胆汁酸もまた、干渉する怖れがあるが、メタノール等とは異なり、石油エーテルは胆汁酸をほとんど溶解しないので、その怖れもないことが明らかとなった。

2) 脂肪酸

脂肪酸の比色定量法には、未だ適確な方法がないが、その中で現在最も信頼できるとされている Itaya-Ui 法¹⁸⁾の久城変法^{21, 22)}を採用することとした。石油エーテルにより、脂肪酸の抽出は終了していることから、この測定に際して、磷酸緩衝液による抽出操作は不必要と考えられたので、その操作は省略したが、その他の点では原法に準じて行なった。この方法は各種の脂肪酸に反応して発色することもあるが、正確な定量性に欠ける憾みがあるが、胆石中の脂肪酸はそのほとんどがパルミチン酸であるとされており^{33, 41)}、パルミチン酸として定量すれば、その誤差は最も少ない

ものと思われる。

1 回目の石油エーテル抽出により遊離脂肪酸、2 回目のそれよりカルシウムと結合している脂肪酸が測定できる。多数の胆石試料を検討した結果、胆石中の遊離脂肪酸含量は極めて微量で、ほとんどが脂肪酸カルシウムとして存在していた。そのため、この2回の抽出検体を併せて測定すれば、測定操作を簡略化できる。

この比色定量法の干渉物質としては、ビリルビン、磷脂質、コレステロールエステルがあげられる。胆石中に存在するレシチンやコレステロールエステルは微量であり、その上ビリルビンの混入が最も少ない石油エーテルを抽出溶媒として使用したこともあって、これらの干渉作用は無視し得るものと考えられた。しかし、本法自体に測定値が変動し易い欠点があり、しかも、微量のビリルビンによっても干渉を受ける点等、注意を要した。

3) ビリルビン

系統抽出過程で、ビリルビンが酸化されビリベルディンへと変化することが考慮されたところから、ジアゾ反応によるビリルビンの測定を避け、ビリルビンを全て酸化し、ビリベルディンとして測定するといったビリルビン酸化法⁶⁹⁾によって、比色定量した。この方法によればビリルビンやビリベルディンが同時に測定できるが、DMSO によって抽出した検体を使用するためか、原法に従った操作では十分な発色が得られなかった。そこで、発色条件について検討を加え、検体と呈色液を混合した上、50~60°C の湯浴中で加温すれば、発色は3分間で最高となり、15分間は発色の減退が認められず、ビリルビン標準液による検量線も原点を通る直線となり、冷却した後も3時間は安定な発色を呈することを明らかにした。そこで、実際には、検体2 ml にエタノール2 ml 及び Fouchet 試薬³⁴⁾1 ml を添加、十分に混合した上、50~60°C の湯浴中で5分間加温した後、流水中で冷却、波長700 nm にて比色定量した。なお、DMSO を用いてビリルビン標準液を用時調整し、求めた検量線は8 mg/dl まで原点を通る直線となった。

4) ビリルビンとビリベルディンの分別比色定量法

前述した胆汁色素直接抽出法によって採取した検体について、Malloy-Evelyn 法²⁴⁾によってビリルビンを、ビリルビン酸化法によってビリルビンとビリベルディンを測定した。後者の測定値より前者を除いた値が、ビリベルディンの含有量となる。しかし、Malloy-Evelyn 法に於いては、市販ビリベルディンを用いて

検討したところ、それが干渉作用を及ぼし、正の誤差を生ずるため、ビリルビン値が含まれている試料では真のビリルビン値の測定はできず、その近似値を得るに止まることが判明した。

なお、検量線を作製するビリルビン標準液の発色についても検討、DMSO:1N 塩酸=99:1の溶媒のビリルビン標準液とDMSO単独溶媒のそれとが、それぞれ可視域吸収スペクトル、吸光度の点ではほぼ一致したため、便宜上後者を標準液として使用することにした。

5) カルシウム

Connerty and Briggs の O-cresolphthalein complexone による直接法 (OCPC 法)^{5,39)} によって比色定量した。すなわち、検体 0.1ml と呈色液 10ml を混合後、570nm で比色した。なお、標準液は、炭酸カルシウムを 1N 塩酸で溶解し調製したが、OCPC 法では検体の pH 変化により発色が変わ動するため、標準液と検体は共に 1N 塩酸を使用する必要がある、4N 塩酸抽出の場合には、4 倍希釈して測定を行なうようにした。

6) 磷

比較的簡易な操作で、安定した発色を得られる Goldenberg 法⁸⁾ によった。すなわち、660nm で比色定量したが、この際の検体の pH 変化は、発色に何等影響を与えなかった。

胆石中で磷を含有する物質は、レシチンと磷酸カルシウムである。レシチンは石油エーテルによって抽出されるため、塩酸抽出される磷化合物は、磷酸カルシウムだけと考えてよい。また、たとえ検体中にレシチンが存在していても、この比色法では発色しないため、測定した磷は全て無機の PO_4 由来のものとと考えてよい。そこで、測定した磷の値から、計算によって PO_4

を算出し、磷は全て PO_4 として表現することにした。

7) 炭酸

黒色石や無機石中にしばしば含まれている炭酸カルシウムは、塩酸抽出操作の際、カルシウムと炭酸ガスに分解され、炭酸ガスは気泡となって大気中に拡散する。この炭酸ガスは、簡易な測定法がないため、従来余り考慮されていなかった。しかし、炭酸カルシウム含量が90%以上の胆石もあり、無視できないことも少なくない。

胆石中のカルシウム化合物としては、脂肪酸カルシウム、ビリルビンカルシウム、炭酸カルシウム、磷酸カルシウム等がある⁵⁵⁾。①脂肪酸はそのほとんどがパルミチン酸で、それがカルシウムと結合しているものと考えられる。従って、パルミチン酸とカルシウムは、2:1の分子比、12.7:1の重量比となるから³⁵⁾、脂肪酸の測定値よりそれと結合するカルシウム量を算出し得る。②ビリルビンとカルシウムは、1:1の分子比で結合しているとされている³⁵⁾。これは 14.6:1の重量比となり、ビリルビンの測定値から、それと結合するカルシウム量を算出し得る。③胆石中の磷酸カルシウムは、apatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$) と whitlockite ($\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) の型でそれぞれ存在するものとされている^{53,51)}。しかし、存在頻度が高いのは apatite であるところから^{65,51)}、この apatite の構造式にもとづいて PO_4 と結合するカルシウム量を算出した。

以上のような三つのカルシウム化合物として存在するカルシウム量を総計し、測定し得た全カルシウム値からその総計を差し引くと、残ったカルシウム値が、炭酸カルシウムとして存在しているものと見做し得る。この値から CO_2 量を算出した。このようにして算出した CO_2 計算値は、赤外線吸収スペクトルによる検討成績ともよく一致した。

表2 系統的抽出法に於ける各種成分の添加回収率

成分 (比色定量法)	回収率 %	平均回収率 (n=5) %
コレステロール (Zak-Henly 法)	94~101	98
パルミチン酸 (Itaya-Ui-久城変法)	96~106	101
カルシウム (OCPC 法)	97~104	101
磷 (Goldenberg 法)	100~102	101
ビリルビン (ビリルビン酸化法)	98~105	102

表3 胆汁色素直接抽出法に於けるビリルビンの添加回収率

比色定量法	回収率 %	平均回収率 (n=5) %
Malloy-Evelyn 法	97~100	99
ビリルビン酸化法	95~100	98

表4 合成モデル胆石の組成

成 分	組 成
コレステロール	39.7 %
パルミチン酸	10.1
パルミチン酸 カルシウム	10.1
炭酸カルシウム	10.1
第3 燐酸 カルシウム	10.0
ビリルビン	20.0
合 計	100.0 %

表5 合成モデル胆石成分の回収率

成 分	回 収 率	平均回収率 (n=5)
コレステロール	92~101 %	97 %
パルミチン酸	99~104	101
パルミチン酸 カルシウム*	101~111	105
カルシウム*	91~101	97
燐 *	103~105	104
ビリルビン	99~104	102

* パルミチン酸カルシウムはカルシウムを除いた値より、カルシウムと燐は計算値より、回収率を算出した。

[III] 抽出法と定量法に於ける精度の検討

1) 各種定量法に於ける添加回収試験

コレステロール系石2個、ビリルビン系石2個、黒色石1個の合計5個の胆石試料について図2の如く系統的抽出を行ない、採取した検体にそれぞれ、コレステロール、パルミチン酸、ビリルビン、カルシウム(炭酸カルシウム)、燐(燐酸2水素カリウム)を添加し、前述の各種比色定量法を実施し、その回収試験を行なってみた。その成績は表2の如くで、各成分とも94~106%という良好な回収率の得られることが判明した。

また、図3の如く、胆汁色素直接抽出法について、ビリルビン系石試料から抽出した検体に、市販ビリルビンを添加し、ビリルビン酸化法と Malloy-Evelyn 法をそれぞれ実施し、その回収試験を行なってみたが、この際にも、表3の如く、やはり95~100%という良好な回収率が得られた。

2) 合成モデル胆石粉末による検討

胆石は多数の成分の混合体で、未知の成分をも含有するため、その成分が正確に測定できているかどうかの確認は困難である。また、抽出操作中に成分が変化することも、大いに考慮する必要がある。そこで、コレステロール、パルミチン酸、パルミチン酸カルシウム、ビリルビン、炭酸カルシウム、第3燐酸カルシウムの純品を用いて、胆石のモデルともいべき組成の明らかな粉末を作製し、それを試料として分析を行ない、抽出法と定量法の精度を検討した。表4の如き組成のモデル胆石粉末を、瑪瑙乳鉢で混合調整し、これを試料として前述の系統的抽出法と比色定量法を行ない、既知の成分量と比較検討してみたところ、表5

のように極めて良好な回収率の得られていることが判明した。

考 按

本邦における胆石症は、年々増加の一途をたどり、なかでもコレステロール系石症例の増加は、顕著となっている^{12,30)}。胆石症の病態の解明も著しく進み、コレステロール系石では、ケノデオキシコール酸^{5,62,59)}やウルソデオキシコール酸²³⁾などの胆汁酸製剤による、内科的胆石溶解療法まで導入されてきた。しかし、内科的胆石溶解療法の適応が、全てのコレステロール系石症例にあてはまるわけでもなく、しかも、胆石にはコレステロール系石以外に、ビリルビン系石や最近話題の黒色石^{31,64,50)}等が存在する。種々の検討により、これらの胆石は、それぞれ成因が異なることが推測されており、治療法も当然胆石の種類別に考慮する必要がある^{13,58)}。従って、胆石の構成成分を分析し、その胆石を分類することは、胆石症の治療方針の決定や成因の解明に当たって、重要な意義を持つ⁶⁰⁾。

従来から、胆石においては、化学的分析、X線回折^{61,51,52)}、分光分析^{36,38,67)}、顕微鏡学的分析³⁷⁾、組織学的分析^{28,41)}、赤外線吸収スペクトル分析^{7,4,20,56,57)}等が、更に最近では走査電子顕微鏡^{44,45,46,47,29)}やX線マイクロアナライザーによる分析^{10,48)}等が、行なわれるようになってきた。しかし、これらの詳細な分析によっても、胆石の分類法は未だ確立されるに至っていない。また、胆石の分類は、これら各種の分析法によらず、表面や断面の肉眼的観察によっても行なわれてきたが、胆石中の各種構成成分の組成が判定できないため、分類を誤り易く、しかも、分類に困難を感ず

るような場合も少なくない。このような問題は、胆石が多数の成分によって構成されている複雑な物質であり、その組成を簡易、迅速、正確に分析できる良い方法が無かったことに起因する。

現在のところ、各種分析法の中で、胆石構成成分の組成を分析できる最も良い方法は、化学的分析法と赤外線吸収スペクトル分析法とされている⁵⁰⁾。前者は、胆石構成成分を正確に定量できるが、分析操作が複雑で迅速性に欠け、後者は、微量の試料で簡易迅速に行なうことができるが、定量性に欠けるという憾みを有する。胆石構成成分の組成を、多数例で比較検討し、胆石を正確に分類するためには、定量性に優れた分析法の普及が必要条件であり、この点からいえば、化学的分析法が適切な方法といえる。しかし、胆石の化学的分析法に関しては、既に多数の報告があるとはいへ、前述の如く赤外線吸収スペクトル分析法に比し、操作が複雑で長時間を要し、しかも、大量の試料を必要とする欠点があった。化学的分析法を有用な方法とするには、これらの欠点を改良し、微量の試料で、簡易な操作によって迅速かつ正確に、また多数の試料を同時に分析できるようにすることが必要である。このような方法が開発できれば、その分析結果から、正確な胆石の分類が行なえるため、胆石症の治療方針の決定にも役立ち、ひいては、胆石の成因解明に対しても重要な情報を提供すると考えられる。かかる観点から、胆石の化学的分析法について再検討を加え、簡易で迅速かつ正確な新しい化学的分析法を開発した。

新たな観点から開発したこの化学的分析法は、微量の試料でそれが行なえるため、胆石の部位別分析も可能となり、より詳細な成分組成の比較検討ができた^{26, 27)}。また、注意深く行なえば、1mg以下の試料でも分析可能であり、この点では赤外線吸収スペクトル法に比肩し得るものであった。

胆石の化学的分析法に於いて、最も重要となるのはその構成成分の抽出法である。長時間を要し、複雑な操作を必要とする欠点は、すべて抽出法に於ける問題であった。そこで、抽出時間は超音波振盪の導入によって短縮し、溶媒と抽出残渣との分離は遠心分離法によって簡易化し、しかも抽出過程を通して同一の試験管内でそれが行なえるようにした。そのためには、気密性の高いすり合わせ部分を持った試験管を使用し、抽出溶媒が漏出することを防ぐ必要があった。また、抽出過程における加温操作は、成分の変質を防ぐためでき得る限り避け、その実施は1N塩酸抽出操作時の

みに限った。

胆石中に存在する物質は、前述の如く多数あるが、それに対して、1) 石油エーテル、2) 1N塩酸、3) 石油エーテル、4) DMSOの順に抽出操作を加えることにした。

最初の石油エーテルでは、コレステロール、コレステロールエステル、遊離脂肪酸、レシチンが抽出されてくる。多数の有機溶媒についてその抽出成績を比較検討したが、石油エーテルの利点は、ビリルビンや脂肪成分以外の物質の混入が、全くといってよい程無く、定量の際に与える影響を無視し得ることであった。この点に関し、石油エーテルとメタノールのそれぞれについて検討したが、メタノールではビリルビンの混入が認められ、しかも脂肪酸カルシウムが遠心分離できずに混入してくるといった事実のあることも判明するに至った。しかし、コレステロールについては、石油エーテルの抽出力にやや難点があり、2~3回抽出操作を行なう必要があった。このため、コレステロールの定量は、その後に行なう石油エーテルによる抽出検体と併せて測定し、この欠点を補った。

次いで1N塩酸により、無機物質、それも主としてカルシウムと磷の抽出を行なう。塩酸抽出を石油エーテル抽出の後に行なう理由は、そうすることによって第1に、遊離脂肪酸と脂肪酸カルシウムとをそれぞれ分別抽出し得ること、第2は、初回に塩酸抽出を行なうと、遠心分離によってもコレステロールと考えられる浮遊物を分離し得ないためである。前述の如く1N塩酸は、4N塩酸に比較してカルシウムの抽出がやや悪く、厳密な分析には4N塩酸を使用する必要があった。

ここで再び、石油エーテルによる抽出を行なうが、これ以外の有機溶媒による時は、胆汁色素の混入が著明であり、使用できなかった。石油エーテルは揮発性が高いため、実験室内を恒温化する必要や、気密性の高い容器を使用し、手早く操作を進める等の注意が必要であるが、気化し易いという点で却って抽出残渣の乾固には有利であった。

胆汁色素の抽出は、クロロホルム、DMFA、DMSOで検討したが、DMSOが最もビリルビンを溶解する力を有しており、クロロホルムに難溶のビリルベリンに対する溶解力も強いこともあって、これを選択することにした。

最終抽出残渣は、水洗後遠心分離し、試験管底より回収し、その重量を測定するが、これを以て抽出過程

は全て終了したことになる。なお赤外線吸収スペクトルの検討によって、抽出の対象とした物質の残存は全く無いことを確認した。

定量法は、全て比色定量法によったが、最近、市販の簡便な Kit が種々開発されており、これら Kit 類の応用も可能であり、また前述の測定成分以外の、たとえばレシチンなどの測定も可能となっている。

測定した 磷は、胆石中では PO_4 として存在すると考えられるところから、計算により PO_4 として算出、表現した。また、 CO_3 も計算により算出した。なおビリルビンカルシウムについては、種々の検討を加えた結果、必ずしもビリルビンとカルシウムとは 1:1 の分子比で結合しているとは限らないことが推測されるに至った⁵⁴⁾。この点については今後更に注意深く検討する必要があるように考えられる。

以上の系統的抽出法と比色定量法の精度については、モデル胆石粉末を作製し検討したが、極めて良好な結果が得られ、満足できる分析法であることを確認した。

さて、胆石中に存在する胆汁色素は、ビリルビンとされてきたが、ビリベルディン等の他の物質の存在も推定されるため、本研究ではビリルビンとビリベルディンを分別定量する直接法をも検討し、それを考案した。この方法により、多数の胆石試料を検討してみたが、黒色石の一部に於いてのみ、ビリベルディンの存在が確認された。また、この抽出溶媒を利用して、ビリルビン系石と市販ビリルビンとについて、分光光度計により可視域吸収スペクトルを比較検討したが、両者のスペクトルには、最高吸収波長や波形において明らかな差異が認められた。現在のところ、その本態は不明であるが、胆石中における胆汁色素の存在形態に関しては、今後更に検討を要する。

結 語

複雑で長時間の操作を必要とした胆石の化学的分析法に、新たな観点から検討を加え、微量の試料で、しかも簡易、迅速、正確に行なえる化学的分析法を開発した。

1) 胆石を蒸留水にて洗浄後、割面より試料を採取し、瑪瑙乳鉢で微細な粒子とする。試料は 1~10mg あれば分析可能であるため、胆石の部位別分析も行なえるようになった。

2) 胆石構成成分の抽出操作には、超音波振盪法と遠心分離法を導入することにより、その簡易迅速化が可能となった。

3) 抽出に当っては、石油エーテル、1N 塩酸、石油エーテル、ジメチルスルフォキシド (DMSO) の順にそれぞれ溶媒として使用した。すなわち、最初の石油エーテルは、コレステロールと遊離脂肪酸を、1N 塩酸は、カルシウムと無機磷を、2 回目の石油エーテルは、残存するコレステロールとカルシウムが除去された脂肪酸を、DMSO は、ビリルビン等の胆汁色素を、それぞれ抽出するために使用した。この様な溶媒の応用によって、それら測定の対象となった物質は、何れも良好に抽出できていることが確認された。ただし、カルシウムを正確に抽出するには、1N 塩酸でなく 4N 塩酸を使用する必要があった。

4) コレステロール (Zak-Henly 法)、脂肪酸 (Itaya-Ui-久城変法)、ビリルビン (ビリルビン酸化法)、カルシウム (OCPC 法)、磷 (Goldenberg 法) の 5 成分の各種比色定量法に於いて、それぞれ添加回収試験を行なったが、良好な回収率が得られた。また、モデル胆石を作製し回収試験を行なったが、良好な回収率が得られ、この化学的分析法の正確性が確認できた。

5) 胆石中のビリルビンとビリベルディンとを、簡易迅速に抽出し、分別定量できる方法を開発した。抽出には 1N 塩酸 1 容に対し、DMSO 99 容の割合に混じた溶媒を使用する。ビリルビンは Malloy-Evelyn 法、ビリルビンとビリベルディンとはビリルビン酸化法でそれぞれ測定し、後者より前者の測定値を減じるとビリベルディンの値が求められる。黒色石の一部にはビリベルディンが含まれていた。

稿を終るにあたり、御指導と御校閲を賜った日笠頼則教授、並びに終始御指導を戴いた故長瀬正夫博士、及び谷村 弘博士に深く感謝の意を表す。

本研究の一部は、昭和53年度文部省科学研究費 No. 244050 の補助によるものである。

本論文の要旨は第20回日本消化器病学会秋季大会 (1978, 岐阜) において発表した。

参 考 文 献

- 1) Been JM, Bills PM, et al: Microstructure of gallstones. *Gastroenterology* 76: 548-555, 1979.
- 2) Bills PM and Lewis D: A structural study of gallstones. *Gut* 16: 630-637, 1975.
- 3) Bogren H and Karsson K: On the pigment in biliary calculi. *Scandinav J Clin Lab Invest* 15: 569-572, 1963.
- 4) Chihara G, Kobayashi E, et al: Medical and biochemical application of infrared absorption spectra IV. *Chem Pharm Bull* 8: 771-777, 1960.
- 5) Connerty HV and Briggs AR: Determination

- of serum calcium by means of orthocresolphthalein complexone. *Am J Clin Path* 45: 290-296, 1966.
- 6) Danzinger RG, Hofmann AF, et al: Dissolution of cholesterol gallstones by chenodeoxycholic acid. *N Eng J Med* 286: 1-8, 1972.
- 7) Edwards JD, Adams WD, et al: Infrared spectrum of human gallstones. *Am J Clin Path* 29: 236-238, 1958.
- 8) Goldenberg H and Fernandez A: Simplified method for the estimation of inorganic phosphorus in body fluids. *Clin Chem* 12: 871-882, 1966.
- 9) Harring W and Horsters H: Röntgenbild und chemische Zusammensetzung von Gallensteinen. *Fortschr Röntgenstr* 46: 546-553, 1932.
- 10) 端野博康, 杉田太一, 他: 胆石中に含まれる微量元素のX線マイクロアナライザーによる分析的研究. *日外宝* 44: 21-50, 1975.
- 11) Henly AA: The determination of serum cholesterol. *Analyst* 82: 286-287, 1957.
- 12) 日笠頼則: コレステロール系胆石の成因について. *日本医事新報* 2805: 13-20, 1978.
- 13) Hikasa Y, Nagase M, et al: Epidemiology and etiology of gallstones. *Arch Jap Clir* 49: 555-571, 1980.
- 14) Holt PF and Tarnoky AL: The analysis of calculi using microchemical methods. *J Clin Path* 6: 114-117, 1953.
- 15) 堀 太郎, 杉田陸海: 脂質の抽出法, 生化学実験講座 3. 脂質の化学, 日本生化学会編, 東京, 東京化学同人 1974.
- 16) 井上朝生: 胆石内胆汁色素及び金属成分に関する研究. *福岡医誌* 58: 741-762, 1967.
- 17) 石井 暢編: 脂質および関連物質の測定法, 臨床検査技術全書第6巻, 臨床化学検査 II, 医学書院 (東京) 1975.
- 18) Itaya K and Ui M: Colorimetric determination of free fatty acids in biological fluids. *J Lipid Reserch* 6: 16-20, 1965.
- 19) 金井 泉, 金井正光編: 臨床検査法提要. 改訂第27版, VII61, 金原出版 (東京) 1975.
- 20) 亀田治男, 千原呉郎, 他: 赤外線吸収スペクトルによる胆石の分析とその臨床的応用. *最新医学* 13: 445-468, 1958.
- 21) 久城英人, 高野圭以, 他: 血清遊離脂肪酸比色定量法に関する検討 (第7報), Itaya-Ui 改良法について. *臨床病理* 18: 833-837, 1970.
- 22) 久城英人, 福井 徹: 遊離脂肪酸. *臨床化学* 1: 42-51, 1971.
- 23) Makino J, Shinozaki K, et al: Dissolution of cholesterol gallstones by ursodeoxycholic acid. *Jpn J Gastroenterol* 72: 690-691, 1975.
- 24) Malloy HT and Evelyn KA: The determination of bilirubin with the photoelectric colorimeter. *J Biol Chem* 119: 481-490, 1937.
- 25) 三宅 博, 鍛塚登喜郎, 他: 日・米・中華三国に於ける胆石の化学的分析による比較研究. *福岡医誌* 54: 781-826, 1963.
- 26) 向原純雄, 谷村 弘, 他: 黒色胆石の成分分析とその分類について. *日消会誌* 77 (臨時増刊号): 555, 1980.
- 27) 向原純雄, 谷村 弘, 他: 肝内結石症における胆石成分分析の意義について. 第22回日消会講演予報集: 199, (鹿児島) 1980.
- 28) 永光慎吾: 胆石の組織化学的研究—特に蛋白質を中心として. *日外会誌* 57: 1542-1547, 1956.
- 29) Nagase M, Tanimura H, et al: Scanning electron microscopic study of alimentarily gallstones. *Abstracts of international congress of gastroenterology*: 132, (Budapest) 1976.
- 30) Nagase M, Tanimura H, et al: Present features of gallstones in Japan, A collective review of 2,144 cases. *Am J Surg* 135: 788-790, 1978.
- 31) 長瀬正夫, 谷村 弘, 他: 胆石手術症例3,387例の集計結果, 特に黒色胆石について. *外科治療* 40: 129-134, 1979.
- 32) 中嶋久裕: 胆石の化学的分析. 第3報コレステリン系胆石の分析結果について. *弘前医学* 11: 345-356, 1960.
- 33) Nakayama F: Quantitative microanalysis of gallstones. *J Lab Clin Med* 72: 602-611, 1968.
- 34) Naumann HN: CIX. Studies on bile pigments II. A new test for bilirubin in urine and its use for detection of bilirubin in normal urine. *Biochem J* 30: 762-764, 1936.
- 35) Nishimura M: Über Die chemische Zusammensetzung Der Gallensteine. *J Biochem (Tokyo)* 28: 265-292, 1938.
- 36) 西村正也: 胆石の構造と分類論. *臨床外科* 3: 145-151, 1948.
- 37) 野間元繁人: 邦人胆石の構造に関する顕微鏡的研究. *医学研究* 18: 415-426, 1944.
- 38) 太田直一: 生体内に於ける無機成分の研究 (第一報) 人体結石の無機成分について. *日本化学雑誌* 74: 506-510, 1953.
- 39) 太田拔穂, 杉田民代, 他: O-cresolphthalein complexone による Ca 比色定量法に関する2, 3の検討. *臨床病理* 16: 659-662, 1968.
- 40) Pickens M, Spanner GO, et al: The composition of gall stones and their solubility in dog bile. *J Biol Chem* 95: 505-507, 1932.
- 41) Sanjo T: Biochemical and histochemical study on fatty acid-calcium gallstones. *Tohoku J Exp Med* 161: 237-249, 1970.
- 42) 佐藤丈夫: 胆石の化学分析 第1報胆石成分の定量に関する基礎実験. *弘前医学* 12: 695-706, 1961.
- 43) 佐藤丈夫: 胆石の化学分析 第2報ビリルビン系胆石の分析結果について. *弘前医学* 12: 707-

- 715, 1961.
- 44) 瀬戸山元一, 谷村 弘, 他: コルステロール色素混合石の実験的形成法とその構造に関する研究. 日消会誌 73: 1429, 1976.
- 45) 瀬戸山元一, 谷村 弘, 他: 胆石の微細構造に関する研究(Ⅱ)いわゆる黒色石について. 日消会誌 74: 980, 1977.
- 46) 瀬戸山元一, 翠川 修, 他: 実験的混合石形成とその微細構造(Ⅲ) 日消会誌 75: 1121, 1978.
- 47) Setoyama M, Tanimura H, et al: Ultrafine structures and chemical composition of dietarily produced gallstones and of human gallstones. Abstracts of VI world congress of gastroenterology: 91, (Madrid) 1978.
- 48) Setoyama M, Tanimura H, et al: Ultrafine structure and atomic composition of human gallstones studied by scanning electron microscope equipped with X-ray microanalyzer. J Clin Electron Microscopy 12: 835, 1979.
- 49) Simmons NA: An automated method for serum bilirubin determination. J Clin Path 21: 196-201, 1968.
- 50) Soloway RD, Trotman BW, et al: Pigment gallstones. Gastroenterology 72: 167-182, 1977.
- 51) Sutor DJ and Wooley SE: X-ray diffraction studies of the composition of gallstones from English and Australian patients. Gut 10: 681-683, 1969.
- 52) Sutor DJ and Wooley SE: A statistical survey of the composition of gallstones in eight countries. Gut 12: 55-64, 1971.
- 53) Sutor DJ and Wooley SE: The nature and incidence of gallstones containing calcium. Gut 14: 215-220, 1973.
- 54) Sutor DJ and Wilkie L: The crystalline salts of calcium bilirubinate in human gallstones. Clin Science and Molecular Medicine 53: 101-103, 1977.
- 55) Sutor DJ and Wilkie L: Calcium in bile and calcium salts in gallstones. Clin Chim Acta 79: 119-127, 1977.
- 56) Suzuki N and Toyoda M: On infrared absorption spectra of bilirubin and calcium bilirubinate. Tohoku J Exp Med 88: 353-360, 1966.
- 57) Suzuki N, Nakamura Y, et al: Infrared absorption spectroscopy of pure pigment gallstones. Tohoku J Exp Med 116: 259-265, 1975.
- 58) Tanimura H, Shioda R, et al: Initiating factors in formation of cholesterol gallstones. Arch Jap Chir 47: 427-445, 1978.
- 59) 谷村 弘, 竹中正文: Chenodeoxycholic acid による胆石溶解に関する実験的研究. 日外宝 44: 3-20, 1975.
- 60) 谷村 弘: 胆石の生成. Medico 11: 4360-4364, 1980.
- 61) 田村一磨: X線分析法に依る邦人胆石の結晶学的研究. 日外会誌 43: 1525-1555, 1942.
- 62) Thistle JL, Hofmann AF: Efficacy and specificity of chenodeoxycholic acid therapy for dissolving gallstones. New Eng J Med 289: 655-659, 1973.
- 63) Thoma GE, Kitzberger DM, et al: A spectrophotometric method for determination of urinary bilirubin. J Lab Clin Med 33: 1189-1192, 1948.
- 64) Trotman BW, Ostrow JD, et al: Pigment vs cholesterol cholelithiasis: comparison of stone and bile composition. Am J Dig Dis 19: 585-590, 1974.
- 65) Uldall A, Petri C, et al: The composition of gallstones from geriatric patients. Methods for the determination of cholesterol and of black substances in gallstones. J Clin Chem Clin Biochem 14: 577-579, 1976.
- 66) Yagi T: Some observation on chemical components of gallstones in the Sendai district of Japan. Tohoku J Exp Med 72: 117-130, 1960.
- 67) 湯田 伝: 胆石の重金属の意義. 医学研究 23: 1434-1449, 1953.
- 68) Zak B: Simple rapid microtechnic for serum total cholesterol. Am J Clin Path 27: 583-588, 1957.